

ЭНДОСКОПИЧЕСКАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ МЕТИЛЕНОВЫМ СИНИМ ГЕЛИКОБАКТЕР-АССОЦИИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ У ДЕТЕЙ (клинико-экспериментальное исследование)

ЗАБЛОДСКИЙ А.Н.*, ПЛАВСКИЙ В.Ю.**, ТРЕТЬЯКОВА А.И.**,
КУЗЬМИН С.А.***, ЗАБЛОДСКИЙ И.А.****

Витебская детская областная клиническая больница*
Институт физики НАНБ**, Витебская академия ветеринарной медицины***
Витебский филиал «Медтехноцентра»****.

Резюме. С 1999 года в Витебской детской областной клинической больнице применяется метод эндоскопической лазерной фотодинамической терапии НР-ассоциированной патологии двенадцатиперстной кишки. Доказано бактерицидное действие метиленового синего и низкоинтенсивного лазерного излучения на суточные культуры ряда микроорганизмов. Определена эффективная спектральная полоса, переводящая метиленовый синий в возбужденное состояние с образованием синглетного кислорода, который дает бактерицидный эффект. Метод использован у 78 больных с эрозиями и язвами двенадцатиперстной кишки с положительным эффектом. Эрадикация *H. pyloridis* достигнута у 80,1% пациентов. Сочетание антисептического действия возбужденного метиленового синего со стимулирующим эффектом низкоинтенсивного лазерного излучения является альтернативным методом лечения НР-ассоциированных заболеваний двенадцатиперстной кишки у детей.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, метиленовый синий, двенадцатиперстная кишка, дети.

Abstract. The method of endoscopic laser photodynamic therapy of HP-associated pathology of the duodenum in children has been used in Vitebsk regional children clinical hospital since 1999. The bactericidal effect of methylene blue and low-intensive laser light on one-day culture of some microorganisms was proved. The effective spectral range converting methylene blue in the excited state with the formation of singlet oxygen, which provides the bactericidal effect was determined. This method was used with positive result in 78 patients with erosions and ulcers of the duodenum. Eradication of *H. pyloridis* was achieved in 80,1% of cases. The combination of the bactericidal effect of excited methylene blue with the stimulating effect of low-intensive laser light is an alternative method in treatment of HP-associated duodenal diseases in children.

Пилорический геликобактер (НР) нельзя в настоящее время рассматривать как этиологический фактор язвенной болезни, а правомерно относить к одному звену патогенеза этого заболевания. Отсюда закономерно появился термин «геликобактер-ассоциированная язвенная болезнь». Этим обстоятельством и определяется стратегия антигеликобактерной терапии.

Если проблема лечения язвенной болезни в настоящее время вроде решена, то – излечения (профилактика рецидивов) по-прежнему остается актуальной, несмотря на успешный синтез все более мощных антисекреторных средств, цитопротекторов и антибактериальных препаратов, направленных на эрадикацию *Helicobacter pylori* (НР) из слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки.

По мнению некоторых авторов, ни комплексная противоязвенная терапия, обеспе-

чивающая быструю клинико-эндоскопическую ремиссию язвенной болезни, ни 100% эрадикация НР не гарантируют полных положительных отдаленных результатов лечения [1]. Поэтому поиск новых средств для лечения язвенной болезни является оправданным.

В настоящее время возрастает интерес к лечению многих заболеваний без помощи традиционных медикаментозных средств. Использование факторов внешней среды считается безвредным и, следовательно, физиологичным.

В последние годы происходит активное внедрение лазерных технологий в медицину. При эндоскопическом методе лазерной терапии излучение действует как неспецифический стимулятор обменных и репаративных процессов в периульцерогенной зоне. Вместе с тем эффект эндоскопической лазеротерапии нестойкий, поскольку не устраняет ацидопептического и микробного (НР) факторов, хотя предполагается, что лазерное облучение способствует выделению тканями бактерицидных субстанций [2,6]. Сообщается о бактерицидном действии фотодинамической терапии (т. е. лазерной с применением фотосенсибилизаторов терапии). Предполагается, что фотосенсибилизатор включается в метаболизм микроорганизмов, что делает их более чувствительными к фотодинамическому воздействию [9,13].

Целью исследования было применение фотодинамического (антисептического) эффекта метиленового синего и стимулирующего эффекта низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) для лечения эрозивно-язвенных поражений двенадцатиперстной кишки у детей.

Для достижения этой цели нужно было решить следующие задачи: определить эффективную длину волны лазерного излучения (1), выяснить механизм антисептического действия возбужденного метиленового синего (2), доказать его бактерицидное действие на культуры микроорганизмов (3).

Методы

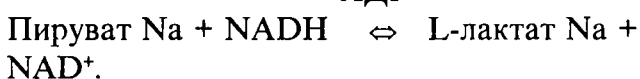
Спектральная полоса поглотительной способности метиленового синего (МС) на разных длинах волн определена на спектрофотометре Specond M40 UV VIS Carl Zeiss (Германия).

В эксперименте использовали следующие реагенты: фермент лактатдегидрогеназа (ЛДГ) из мышц свиньи (Reanal, Венгрия), кофермент никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (NADH) фирмы Reanal, субстрат-пировинограднокислый натрий (пируват) фирмы Serva, метиленовый синий.

В качестве источников излучения использовали гелий-неоновый лазер ЛГН-120 с длиной волны $\lambda = 632,8$ нм.

Влияние лазерного излучения на функциональную активность ЛДГ рассмотрено на примере окислительно-восстановительной реакции превращения пирувата в лактат, катализируемой лактатдегидрогеназой:

ЛДГ



Скорость ферментативной биохимической реакции (показатель биокаталитической активности фермента) измерялась спектрофотометрически Specord M40 UV VIS (Carl Zeiss, Jena), по уменьшению оптической плотности на длине волны $\lambda = 340$ нм, соответствующей максимуму поглощения кофермента NADH. Как известно, при окислении молекул NADH (превращении в NAD⁺) полоса поглощения с максимумом в области 340 нм исчезает. Скорость уменьшения оптической плотности на длине волны 340 нм соответствует скорости уменьшения концентрации молекул NADH (в результате перехода в окисленную форму) и отражает скорость протекания рассматриваемой реакции. Концентрации компонентов к моменту начала реакции составляли: ЛДГ – $3 \cdot 10^{-9}$ моль*л⁻¹, пируват – $1,9 \cdot 10^{-4}$ моль*л⁻¹, NADH – $1,5 \cdot 10^{-4}$ моль*л⁻¹ (концентрации подбирались исходя из того, чтобы изменение оптической плотности раствора на длине волны 340 нм во времени в первую мину-

ту протекания реакции было линейным). Растворы готовились на однозамещенном фосфатном буфере, pH 7,3. Для характеристики эффекта действия лазерного излучения на скорость реакции использована величина $\gamma = (\Delta D_0 / \Delta D_K) \cdot 100\%$, где ΔD_0 и ΔD_K - изменение оптической плотности на длине волны 340 нм за первую минуту протекания опытной и контрольной реакции соответственно. Реагентами для контрольной реакции служили необлученные (интактные) растворы. В опытной реакции (в отличие от контрольной) облучению подвергались растворы бинарной смеси ЛДГ - МС. При этом концентрацию сенсibilизатора во время облучения варьировали в диапазоне от $1 \cdot 10^{-6}$ моль * л⁻¹ до $1 \cdot 10^{-5}$ моль * л⁻¹. Концентрация ЛДГ во время облучения составляла $1 \cdot 10^{-7}$ моль * л⁻¹. После прекращения облучения растворы разбавлялись буфером до требуемой концентрации. Аналогичную процедуру разбавления проводили для контрольных растворов.

Для исследований антимикробной активности сочетанного применения НИЛИ и 1% раствора МС на микрофлору в качестве микробного материала использовали маточное содержимое от 5 коров, больных послеродовым гнойно-катаральным эндометритом. Микробный материал рассеивали на чашки Петри с мясопептонным агаром (МПА) и инкубировали в термостате при 37° С 24 часа. Далее выделяли чистые культуры и идентифицировали их. После производили посев каждой выделенной культуры на МПА и инкубировали в термостате при 37° С 1 час. Далее на поверхность МПА наносили 0,5 мл 1% раствора метиленового синего и облучали медицинским лазером ЛГН-111 (30 мВт), $\lambda = 632$ нм при плотности мощности $P = 15$ мВт/см² и экспозиции 5 мин. В качестве контроля использовали культуры, на которых действовали только метиленовым синим или лазером. Результат учитывали после инкубации в термостате при 37°С через 24 часа.

Метод сочетанного лазерного и фотодинамического эффекта метиленового синего был применен в клинике у 97 детей с эрозивно-язвенными поражениями двенадцатиперстной кишки (возраст 9-14 лет). Эрозив-

ный бульбит был у 17 пациентов, язвы двенадцатиперстной кишки – у 80 больных (у 16 – по две язвы). Через распылительный катетер, проведенный по инструментальному каналу эндоскопа, на слизистую луковицы двенадцатиперстной кишки наносился 1-2 мл 0,5% раствора метиленового синего, а антральный отдел орошался 8-9 мл. Затем через биопсийный канал эндоскопа проводился кварцевый световод, и производилось облучение по 1 минуте луковицы двенадцатиперстной кишки и антрального отдела желудка. В качестве источника лазерного излучения использовался гелий-неоновый лазер (лазерный терапевтический аппарат «Лазурит-3М», «Люзар») с длиной волны 632,8 нм, мощность излучения на выходном конце световода 15 мВт. Световод располагался на расстоянии 1-2 см от слизистой луковицы двенадцатиперстной кишки и 1-10 см от антрального отдела желудка. Облучение проводили через день.

Для диагностики НР использовали быстрый уреазный тест (один биоптат из антрального отдела).

Результаты

Эффективная спектральная полоса, переводящая МС в возбужденное состояние, от 550 до 700 nm (рис.1).

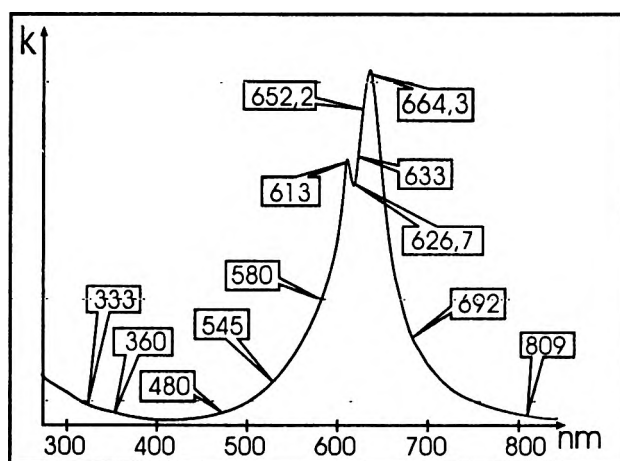


Рис. 1. Оптическая абсорбция метиленового синего. Спектр поглощения в 1 см³ кюветы. По оси X - длина волны в нанометрах. По оси Y – оптическая плотность (максимальное значение шкалы D=2,0). Оптическая плотность – величина, пропорциональная концентрации вещества. Её величина отражает поглощательную способность вещества на разных длинах волн.

Исследования показали, что облучение раствора ЛДГ-МС приводит к эффективному разрушению фермента. Об этом, в частности, свидетельствует снижение ферментативной активности ЛДГ. Так, при облучении указанных растворов (концентрация МС $1 \cdot 10^{-5}$ моль \cdot л $^{-1}$) излучением гелий-неонового лазера (плотность мощности воздействующего излучения $P=1$ мВт/см 2 , время воздействия $t=2,5$ мин.) ферментативная активность ЛДГ снижается на 28 % ($g = 72$ %). Оценки показали, что квантовый выход повреждения составляет $j = 0,5 \cdot 10^{-4}$. Эффект повреждающего действия существенно увеличивается при замене буфера на основе воды таковым на основе деионизированной (тяжелой) воды. Так, при тех же параметрах облучения растворов ЛДГ-МС в тяжелой воде $\gamma = 27$ %, то есть активность ЛДГ снижается на 73 %. Квантовый выход фотоинактивации составляет $\phi = 1,4 \cdot 10^{-4}$. Такое увеличение эффективности фотоповреждающего действия при замене H_2O на D_2O может объясняться участием в фотоповреждении ЛДГ так называемого синглетного кислорода - высоко реакционной формы кислорода, образующейся при передаче энергии электронного возбуждения с молекул сенсibilизатора (МС) на молекулы O_2 , растворенные в облучаемой среде. При этом хорошо известно, что время жизни синглетного кислорода в D_2O в ~ 20 раз выше его времени жизни в H_2O .

Участие синглетного кислорода подтверждается также снижением эффекта инактивации фермента при облучении ЛДГ-МС в присутствии тушителя синглетного кислорода - молекул NADH. В качестве примера на рис.2 показана кинетика инактивации ЛДГ (зависимость ферментативной активности от времени облучения при плотности мощности $P=15$ мВт/см 2) в отсутствие (в момент облучения растворов ЛДГ-МС) молекул NADH (кр.1) и при их концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ моль \cdot л $^{-1}$ (кр.2). Как видно из графика, внесение молекул кофермента в облучаемый раствор частично предохраняет фермент от фотоповреждения (концентрация ЛДГ в момент облучения для указанного раствора составляла $1 \cdot 10^{-7}$ моль \cdot л $^{-1}$, концентрация МС - $1 \cdot 10^{-7}$ моль \cdot л $^{-1}$). Отметим так-

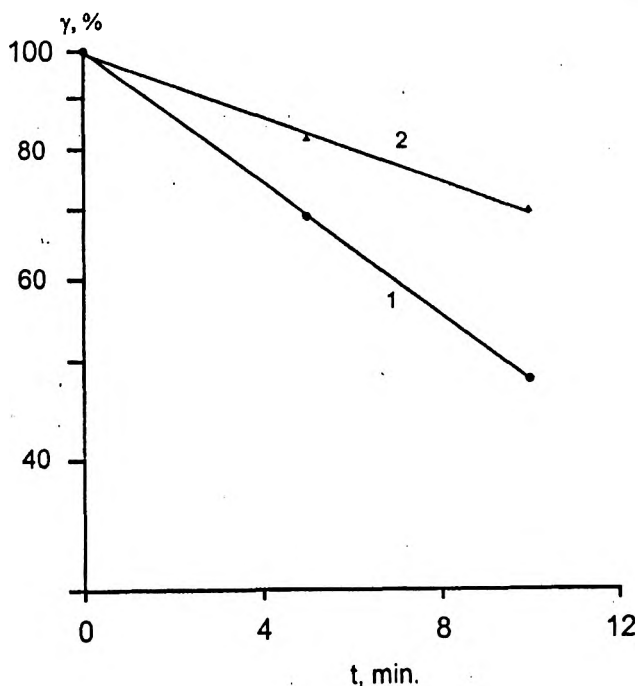


Рис.2. Кинетика инактивации лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

же, что на представленном графике ось ординат показана в логарифмическом масштабе. Линейность зависимости эффекта инактивации от времени воздействия в полул로그арифмическом масштабе свидетельствует об экспоненциальном законе убыли активных форм молекул ЛДГ с течением времени облучения.

Исследования показали также, что эффект фотоповреждения молекул фермента, сенсibilизированный МС, носит необратимый характер: активность фермента не восстанавливается с течением времени после прекращения облучения.

Микробиологическими исследованиями установлено, что сочетанное применение лазера и 1% раствора метиленового синего проявило выраженную антимикробную эффективность по отношению к *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus piogenes* и *Proteus vulgaris*: поверхность МПА в области воздействия оставалась стерильной, тогда как вокруг наблюдался значительный рост колоний. В области применения 1% раствора метиленового синего на поверхности МПА наблюдался рост единичных колоний *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. В области применения одного лазера на поверхности МПА наблюдался активный рост колоний *Staphylococcus*

aureus, *Streptococcus piogenes*, *Proteus vulgaris* и *Escherichia coli*.

У всех пациентов эрозии и язвы зажили, т. н. фоторезистентности, которая наблюдается у взрослых в ответ на лазерное излучение, мы не наблюдали. Эрозии в луковице двенадцатиперстной кишки зажили за $5,5 \pm 0,1$ дня после 1-4 сеансов (в среднем 2,2), а язва – за $8,0 \pm 0,1$ дня после 3-6 сеансов (в среднем 4,4). Анализ части пациентов ($n=17$), которым производили уреазный тест после каждого сеанса лазеротерапии с метиленовым синим, показал, что после 2-3 лечебных сеансов положительный тест на НР сменялся отрицательным. К моменту заживления эрозивно-язвенных поражений эрадикация НР составила 80,1%. Из 47 пациентов, прослеженных в течение 1 года, рецидив язвы двенадцатиперстной кишки возник у 3 больных (6,38%) (причем у одного – дважды). Положительная реакция на НР была только у 1 из них.

Обсуждение

Почти у всех взрослых и детей с язвой двенадцатиперстной кишки отмечается присутствие НР на желудочной слизистой [8,10]. Однако у большинства людей, инфицированных НР, язвенная болезнь не разовьется. Поскольку НР колонизирует только слизистую желудка, то его связь с язвой двенадцатиперстной кишки является парадоксальной. Предполагается, что НР заселяет участки кишечной метаплазии в двенадцатиперстной кишке. У детей НР инфекция слизистой антрального отдела и желудочная метаплазия в двенадцатиперстной кишке – независимые факторы риска для изъязвления [7,11]. Эрадикация НР в слизистой желудка ведет к долговременному выздоровлению от язвенной болезни как у детей [8], так и у взрослых [10]. Комбинированные данные из 30 исследований показали, что частота рецидива язвы двенадцатиперстной кишки составила 61% у пациентов с оставшейся НР инфекцией, по сравнению с 3% у больных, санированных от НР [11], по нашим данным – 2,1%. Однако у 2 пациентов, а у одного дважды, за 1 год после лечения возникли реци-

дивы язвы, несмотря на отсутствие НР. Исследования рН содержимого желудка натощак у них показало выраженную гиперацидность ($pH < 1,0$). В то же время у 19,9% пациентов язвы двенадцатиперстной кишки зажили, несмотря на отсутствие эрадикации НР.

Резистентность НР к антимикробным препаратам [5] и побочные эффекты многокомпонентных схем у 30% [12] больных диктуют поиск альтернативных методов лечения. В. Ф. Новиков с соавт. при лечении гастродуоденальных язв применили их обработку 1% раствором МС с последующим облучением некогерентным красным светом [13]. По данным В. А. Новицкого с соавт., противовоспалительная терапия, усиленная лазеротерапией как гелий-неоновым, так и другими лазерами, обладала более сильным противовоспалительным действием, чем традиционное лечение и позволяла максимально продлить клиническую ремиссию заболевания [4]. Следует, однако, отметить, что вопрос о молекулярном механизме терапевтического действия НИЛИ до настоящего времени является дискуссионным. Наш метод является этиопатогенетическим. Само лазерное излучение на микроорганизм не действует, МС является бактериостатическим препаратом, а уже МС, возбужденный лазерным излучением, выделяет синглетный кислород, обладающий бактерицидным эффектом.

Выводы

1. Применение фотодинамического эффекта метиленового синего в лечении НР-ассоциированной патологии двенадцатиперстной кишки у детей себя оправдывает.

2. Сочетанное применение низкоинтенсивного лазерного излучения и метиленового синего позволяет добиться выраженного антимикробного эффекта против *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus piogenes*, *Proteus vulgaris* и *Escherichia coli*.

3. Фотодинамическая лазеротерапия эрозивно-язвенных поражений двенадцатиперстной кишки позволяет количественно и качественно изменить медикаментозную терапию в плане предотвращения прагмазии.

4. Существенную роль в антисептическом действии на НР играет синглетный кислород, генерируемый триплетно-возбужденным сенсibilизатором.

5. Язвы двенадцатиперстной кишки заживают, несмотря на отсутствие эрадикации НР. Эрадикация НР не гарантирует положительных отдаленных результатов (у таких пациентов имеет значение кислотный фактор).

Литература

1. Гриневич В. Б., Ткаченко Е. И., Успенский Ю. П. и др. Анализ частоты рецидивирования язвенной болезни в зависимости от характера лечения и ассоциации с пилорическим хеликобактером. // Проблемы излечимости в гастроэнтерологии. Решенные и нерешенные клинические загадки: Труды 25-конф. – Смоленск, 1997. – С. 23-26.
2. Дмитриев Т. В. Лазертерапия язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки // Сов. мед. - 1991. - №4. - С. 57-58.
3. Новиков В. Ф., Онучин П. Р., Романов Э. И. Использование фотодинамического эффекта метиленового синего в лечении гастродуоденальных язв // Росс. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. -1996. -№4. -С. 321.

4. Новицкий В. А., Смолянинов А. Б., Сайденкова М. С. и др. // Клин. мед. – 1998. - №11. – С. 42-46.
5. Реброва Е. Л. // Клин. мед. – 1999. - №8. – С.52-56.
6. Семендяева М. Е., Лебедев Л. В., Матвеев Г. Н. Лазерная терапия гастродуоденальных язв // Клин. мед. – 1980. – Т. 58, № 10. – С. 72-74.
7. Gormally S. M., Kierse B., Daly L., et al. Gastric metaplasia and duodenal ulcer disease in children // Gut. – 1996. – Vol. – 38. – P. 513-517.
8. Drumm B. Helicobacter pylori in the pediatric patients // Gastroenterol. Clin. North. Am. -1993. – Vol. -22. - P.169-182.
9. Minnock A. Photoinactivation of bacteria. Use of cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. // J. Photochem. Photobiol. -1996. – Vol. – 32. – P. – 159-1641.
10. Peterson W. L. Helicobacter pylori and peptic ulcer disease. // N. Engl. J. Med. – 1991. – Vol. – 324. – P. – 1034-1048.
11. Shabib S., Cutz E., Drumm B., et al. Helicobacter pylori infection with gastric metaplasia in the duodenum. Am. J. Clin. Pathol. – 1994. – Vol.102. – P.188-191.
12. Tytgat G. -J. Current indication for Helicobacter pylori eradication therapy // Scand. J. Gastroent. – 1996. – Vol. 31., Suppl. – P. 70-73.
13. Wilson M., Pratten J. Lethal photosensitisation of Staphylococcus aureus. // J. Med. Microbiol. -1995. – Vol. 42. – P. – 62-66.

Поступила 03.09.2001г.
Принята в печать 12.06.2002г.

Медицинская литература Витебского государственного медицинского университета

Крылов Ю.В. Материалы для подготовки к экзамену по патологической анатомии. Учебное пособие. - Витебск: изд-во ВГМУ, 2001. - 183 с.

Диваков М.Г., Аскерко Э.А., Дейкало В.П. Травматология, ортопедия и военно-полевая хирургия. - Витебск: изд-во ВГМУ, 2001. - 69 с.

Дивакова Т.С. Основы лапароскопии и гистероскопии в акушерско-гинекологической практике. - Витебск: изд-во ВГМУ, 2001. - 114 с.

Алексеев Ю.В. Легкая черепно-мозговая травма. - Витебск: изд-во ВГМУ, 2001. - 155 с.